

*506-166*

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
12 septembre 2003 (12.09.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 03/074060 A2**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
**A61K 31/7088, C12N 15/11,**  
A61K 31/04, 38/14, A61P 35/00, 29/00

(74) Mandataires : MARTIN, Jean-Jacques. etc.; Cabinet Regimbeau, 20, rue de Chazelles, 75847 Paris Cedex 17 (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :  
**PCT/FR03/00705**

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Date de dépôt international : 5 mars 2003 (05.03.2003)

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(25) Langue de dépôt : français

Publiée :

(26) Langue de publication : français

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport

(30) Données relatives à la priorité :  
02/02879 7 mars 2002 (07.03.2002) FR

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75016 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : BIGEY, Pascal [FR/FR]; 373 rue des Pyrénées, F-75020 PARIS (FR). IVANOV, Marie-Angèle [BE/FR]; 19, Chemin du Pré de l'Etang, F-94500 Champigny-Sur-Marne (FR). SCHERMAN, Daniel [FR/FR]; 10, rue Erard, F-75012 Paris (FR).

A2

(54) Title: DNA DEMETHYLASE ANTISENSE AND CHEMOTHERAPY COMBINATION

WO 03/074060

(54) Titre : COMBINAISON CHIMIOTHÉRAPIE ET ANTISENS DE LA DNA DÉMÉTHYLASE

WO 03/074060

(57) Abstract: The invention concerns a combination product comprising an antisense oligonucleotide of the gene encoding MBD2-demethylase and at least an agent used in antitumour chemotherapy, in particular bleomycin, for simultaneous, separate or prolonged use for treating proliferative and inflammatory diseases, in particular for cancer treatment.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un produit de combinaison comprenant un oligonucléotide antisens du gène codant pour la démethylase MBD2 et au moins un agent utilisé en chimiothérapie antitumorale, en particulier la bléomycine, pour une utilisation simultanée, séparée ou étalemente dans le temps pour le traitement des maladies prolifératives et inflammatoires, en particulier pour le traitement du cancer.

**Combinaison chimiothérapie et antisens de la DNA déméthylase**

5 La présente invention se rapporte à un produit de combinaison comprenant un antisens du gène codant pour la déméthylase MBD2 et au moins un agent utilisé en chimiothérapie antitumorale, en particulier la bléomycine, pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps pour le traitement des maladies prolifératives et inflammatoires, en particulier pour le traitement du cancer.

10

La méthylation de l'ADN est un mécanisme épigénétique important qui régule l'expression des gènes (1-4). L'une des caractéristiques des cellules cancéreuses réside dans un schéma aberrant de méthylation (5). Deux changements contradictoires du schéma de méthylation ont été antérieurement documentés, à savoir l'hyperméthylation de gènes sélectionnés (6) et l'hypométhylation globale (7).

A l'heure actuelle, on ne sait pas parfaitement quels sont les mécanismes responsables des changements observés dans la méthylation de l'ADN. Il est possible que ces changements soient une conséquence de la dérégulation de l'expression des différents composants de la machinerie de méthylation de l'ADN (8). La machinerie de méthylation de l'ADN est composée d'ADN-méthyltransférase (9), de démethylases (10), (11) et (12), et de protéines de liaison de l'ADN méthylé (MBD) qui interprètent le signal de méthylation de l'ADN (13). Un certain nombre d'observations étayent l'hypothèse selon laquelle la dérégulation de l'ADN-méthyltransférase d'entretien DNMT1 joue un rôle important dans la tumorigenèse (14), (15) et (16). Une question importante est donc de savoir si d'autres composants de la machinerie de méthylation de l'ADN présentent eux aussi un caractère critique pour la transformation cellulaire (8) et (17).

- Il a été proposé que l'hyperméthylation des gènes suppresseurs de tumeur servirait de mécanisme pour rendre silencieux des gènes critiques, qui inhibent différentes étapes de la tumorigénèse. Cette hyperméthylation aurait pour conséquence de favoriser le processus conduisant à la transformation des cellules (18). Des cytosines méthylées 5 sont spécifiquement reconnues par les MBD (13) et (19-21), qui s'associent à des corépresseurs tels que le Sin3A, recrutent des histone-désacétylases pour des gènes méthylés (22-26) et peuvent être trouvées dans des complexes connus de répression de la transcription, tels que le Mi2 (27).
- 10 Le Mecp2, qui est le membre le mieux caractérisé de la famille, n'est probablement pas très important pour ce qui est de rendre les gènes silencieux pendant la transformation, car il n'est pas exprimé dans les cellules cancéreuses (20). D'autres protéines candidates doivent être mises en jeu. Une protéine de liaison de l'ADN méthylé récemment caractérisée, la MBD2, est un candidat intéressant pour les raisons 15 exposées ci-après.

Tout d'abord, l'ADNc de MBD2 a été cloné à partir d'une banque d'ADNc d'une lignée de cellules cancéreuses (28), et il s'est avéré qu'il est exprimé dans des échantillons et des lignées cellulaires de cancer du sein (29). Deuxièmement, la protéine est impliquée 20 non seulement dans la suppression du gène par un mécanisme analogue à celui qui est présenté pour le Mecp2 (24) et (27), mais il s'est aussi avéré qu'elle porte également une activité de déméthylase (28).

L'activité de déméthylase a été antérieurement purifiée à partir d'une lignée de cellules 25 humaines non-petites de cancer du poumon A549 (12), et il s'est de même avéré que la transfection de la lignée de cellule d'embryon P19 par le Ha-Ras proto-oncogène conduit à une augmentation de l'activité de déméthylase (30). Il n'est pas impossible qu'une activité accrue de déméthylase soit associée à une tumorigénèse, et qu'elle pourrait être en partie responsable de l'hypométhylation globale observée dans les 30 cellules cancéreuses (17). Ainsi, la Mbd2/déméthylase pourrait faire partie de la

machinerie impliquée dans la médiation ou l'interprétation des deux changements contradictoires associés au schéma de méthylation de l'ADN dans les cellules cancéreuses, à savoir l'hyperméthylation et l'hypométhylation.

- 5 Bien que cette activité de déméthylase a été contestée par certains groupes (24), il a été montré que la Mbd2b/déméthylase obtenue par recombinaison, exprimée dans une lignée cellulaire SF-9 hétérologue, présente une activité de déméthylase. En outre, la co-transfection de la Mbd2b/déméthylase et des plasmides méthylés provoque une déméthylation de ces plasmides et l'expression forcée de la Mbd2b/déméthylase dans  
10 les cellules PANC-1 conduit à une déméthylation et à l'induction du promoteur endogène MUC-2.

La présente invention apporte les éléments démontrant que la Mbd2/déméthylase est effectivement exprimée dans les cellules cancéreuses, et qu'elle est essentielle à la  
15 croissance de cellules tumorales en culture et *in vivo*.

Aucune combinaison de génothérapie et de chimiothérapie, consistant à associer un agent utilisé en chimiothérapie antitumorale avec une génothérapie sur la base d'un antisens d'un gène impliqué dans le niveau de méthylation de l'ADN comme celui de  
20 la MBD2/déméthylase, n'a été décrite dans l'état de la technique.

Or, en combinant une chimiothérapie utilisant la bléomycine et l'électrotransfert intratumoral d'un plasmide codant pour l'antisens génétique de l'ADN déméthylase humaine MBD2, on obtient un effet synergique puissant dans le traitement des tumeurs. Le principal avantage de l'invention est donc sa surprenante efficacité, puisque, si l'on considère le taux de guérison complète des tumeurs, il est de 10% en utilisant la génothérapie par électrotransfert du gène MBD2 déméthylase seul, et aussi de 10 % avec la chimiothérapie bléomycine seule, et ce taux monte à 40 % en utilisant la combinaison des deux traitements : géno- et chimiothérapie.

**Description**

- Ainsi, la présente invention se rapporte à un produit de combinaison comprenant au moins un oligonucléotide antisens du gène codant pour la déméthylase MBD2 et au moins un agent utilisé en chimiothérapie antitumorale pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps destiné au traitement des maladies prolifératives et inflammatoires.
- 10 Dans un mode de réalisation particulier, l'antisens du gène codant pour la déméthylase MBD2 comprend au moins 15 nucléotides consécutifs de la séquence SEQ ID N°1 ou de sa séquence complémentaires ou de la SEQ ID N°2.

La SEQ ID NO 1 correspond à la séquence décrite dans GENEBANK sous le numéro d'accession AF 072242 (Homo sapiens methyl-CpG binding protein MBD2) mRNA, complete cds).

SEQ ID No 1 :

ggggcggtggcccccagaaggcggagacaagatggccgcctatgcgcgtggaggacctaagaggcggtggccggg  
20 gccacgccccgggcaggaggccgcgtctgtgcgcgcgcgtctatgtatgcgtgcgcgtccccgcgcgcgcgtgc  
ggcgaaaaaaatccggattccaaggctcggttacggagaagcgcagcgccggctggggagggggctggatgc  
cgcgccgcaccggggggaggccgcgtctgcgcgcgtccccgggtgagcggcggcggcagcggcgtgcgcagg  
ggcggcactccgcatacgaggccgcgtccggggccaggccagggcagcgcgcgtccccgggtgagcggcgtgcgcagg  
aaggcgcgtccggggccgcggccgtggccgg  
25 gccggggccggggccgtggccggggacggggacggggcggggccggggccgcggccgtccccggatggcggc  
agcggccgtggccgcacggccggcgtgcggccggcggcagcgggtggcggcggccgtccccgggggggggggg  
gtccccgggtcgaaaatctggctaaatgtggcaagagcgtatgttttgc  
cccgccctccccccggatggaaagaaggaggaaatgtccggatggcaagggatggatggatggatggatggatgg  
acttcagtccaaatgtggtaagaaggatgtccaaatgtggcaaggtacactgttgcgttcacggatggatggatgg  
30 acttcagaactggaaatgtccatgtggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatgg



ctgaagtcaaaactgctgagatcaacagtattcccaggtaacctggccaactgaggcttgcttgcgaacttaccactggact  
gaagtagtagacatcgcttgcagcacttagccagatttcggatcacttccttcatccgggggggagggccg  
ggcaatccatcttcccgctccgtggccggggccccctggggccccgcgcgtcccgacggaaagggac  
cggtccgtcgacgcggcc

- 5 Cette séquence antisens a été utilisée dans le cadre des expériences présentées dans l'exemple 1.

Ainsi, l'invention vise un produit de combinaison tel que mentionné précédemment dans lequel l'antisens comprend au moins :

- 10 a) 15 nucléotides consécutifs de la séquence SEQ ID N°1 ou de sa séquence complémentaire ou de la séquence SEQ ID No 2, ou  
b) une séquence capable de s'hybrider de manière sélective à l'une des séquences définies en a).
- 15 Par « séquence capable de s'hybrider de manière sélective », on entend les séquences qui s'hybrident avec les séquences évoquées ci-dessus à un niveau supérieur au bruit de fond de manière significative. Le bruit de fond peut être lié à l'hybridation d'autres séquences d'ADN présentes, notamment d'autres ARNm présents dans les cellules tumorales ciblées. Le niveau du signal généré par l'interaction entre la séquence 20 capable de s'hybrider de manière sélective et les séquence définies par les SEQ ID NO 1 à 2 ci-dessus est généralement 10 fois, de préférence 100 fois plus intense que celui de l'interaction des autres séquences d'ADN générant le bruit de fond. Le niveau d'interaction peut être mesuré par exemple, par marquage de la séquence utilisée comme sonde avec des éléments radioactifs, comme le <sup>32</sup>P. L'hybridation sélective est 25 généralement obtenue en employant des conditions de milieu très sévères (par exemple NaCl 0,03 M et citrate de sodium 0,03 M à environ 50°C-60°C). L'hybridation peut être effectuée selon les méthodes usuelles de l'état de la technique (notamment Sambrook & al., 1989, Molecular Cloning : A Laboratory Manual).

Par un « agent utilisé en chimiothérapie antitumorale », on entend désigner des agents antinéoplastiques. Parmi ces agents, on peut citer :

- les composés appartenant à la famille des bléomycines (Mueller et al., Cancer, 5 Vol. 40, p. 2787 (1977), Umezawa et al., Journal of Antibiotics, 19A, p. 210 (1966), US 4,472,304, FR2530639, et US 3,922,262), en particulier la bléomycine,
- les cytolytiques divers tels que la dacarbazine, l'hydroxycarbamide, 10 l'asparaginase, la mitoguazone et la plicamycine,
- les agents méthylants, tels que la streptozotocine (2-deoxy-2-(3-methyl-3-nitrosoureido)-D-glucopyranose), la procarbazine (N-(1-methylethyl)-4-[(2-methylhydrazino)methyl]benzamide), la dacarbazine ou DTIC (5-(3,3-dimethyl-1-triazenyl)-1H-imidazole-4-carboxamide), et la Temozolomide (8-carbamoyl-3-methylimidazo[5.1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4-(3H)-one).
- les agents chloroethylants, tels que HECNU (1-(2-chloroethyl)-3-(2-hydroxyethyl)-1-nitrosourea), BCNU (1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea ou carmustine, Bristol-Myers), ACNU (1-(2-chloroethyl)-3-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl-1-nitrosourea), CCNU (1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea ou lomustine), MeCCNU (-2-chloroethyl)-3-(4-methylcyclohexyl)-1-nitrosourea ou semustine), la fotemustine (1-[N-(2-chloroethyl)-N-nitrosoureido]ethylphosphonic acid diethyl ester) et la clomesone (2-chloroethylmethylsulfonylmethanesulfonate) (Pegg et al., Prog. Nucleic Acid Research Molec. Biol. 51: 167-223 (1995)). Ces agents sont davantage décrits dans Colvin and Chabner. Alkylating Agents. In: Cancer.
- d'autres composés alkylants tels que les agents du type Ecteinascidin 743, les 25 duocarmycines (Boger et al. J. Org. Chem. 1990, 55, 4499; Boger et al. J. Am. 30

Chem. Soc. 1990, 112, 8961; Boger et al. J. Am. Chem. Soc. 1991, 113, 6645; Boger et al. J. Am. Chem. Soc. 1993, 115, 9872; Boger et al. Bioorg. Med. Chem. Lett. 1992, 2, 759).

- 5 - les agents pro-apoptotiques sélectionnés parmi les dérivés des glucocorticoïdes, les inhibiteurs des topoisomérases tels que les inhibiteurs de la topoisomérase 2, par exemple les anthracyclines, l'epipodophyllotoxine tel que l'étoposide, les inhibiteurs de la topoisomérase 1, par exemple les dérivés de la camptothecine,
- 10 - les antimétabolites tels que les antifolates, par exemple le méthotrexate, les antipurines, par exemple la 6-mercaptopurine, les antypyrimidiques, par exemple la 5-fluorouracile,
- 15 - parmi les antimitotiques tels que les vinca-alcaloïdes, les taxoïdes tel que le taxotere,

Ces agents antinéoplastiques sont décrits dans Actualité Pharmaceutiques n°302 (Oct 1992) pages 38 à 39 et 41 à 43.

- 20 Dans un aspect préféré, l'invention vise un produit de combinaison tel que défini ci-dessus, dans lequel l'agent est sélectionné parmi les composés appartenant à la famille des bléomycines, en particulier la bléomycine.

Dans un autre mode particulier de réalisation, l'invention porte sur un produit de combinaison mentionné ci-dessus, dans lequel l'oligonucléotide antisens du gène codant pour la déméthylase MBD2 est porté par un vecteur comportant un promoteur permettant son expression efficace dans une cellule eucaryote. Ce vecteur peut également comporter une séquence poly A de terminaison de transcription.

De préférence, le vecteur consiste en un plasmide. En effet, l'utilisation d'un plasmide est plus économique et plus sûr que l'utilisation des virus. De plus, ce mode de réalisation de l'invention permet la réadministration sans déclencher de réponse immunitaire. Ce plasmide comprend avantageusement un promoteur, la séquence antisens selon l'invention et une séquence terminateur de la transcription. De préférence, la séquence de l'antisens est insérée dans le plasmide pcDNA3.1HisA de la compagnie InVitrogen.

Le produit selon l'invention peut comporter en outre un ou plusieurs véhicule(s) pharmaceutiquement acceptable(s). Il est destiné en particulier pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps destiné au traitement du cancer. En ce sens, dans un mode préféré, les formulations sont adaptées à une administration par injection intratumorale.

Les techniques permettant le transfert du plasmide dans les cellules cibles sont bien connues de l'homme du métier. En particulier, on se référera aux techniques d'électrotransfert dans les cellules eucaryotes décrites dans WO 99/01157 et Bettan et al, Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 2000, 52 :83-90. Dans WO 99/01157, une méthode pour transfert *in vivo* des acides nucléiques est proposée en utilisant des champs électriques faibles compris entre 1 et 600 V/cm. D'autres approches sont décrites dans Wolf et al. Science 247, 1465-68, 1990 ; Davis et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 7213-18, 1996) dans lesquelles l'ADN est associé à des composés destinés à favoriser sa transfection, comme des protéines, des liposomes, des lipides chargés ou des polymères cationiques tels que le polyéthylènimine, qui sont de bons agents de transfection *in vitro* (Behr et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6982-6, 1989 ; Felgner et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7413-7, 1987 ; Boussif et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 7297-301, 1995).

Ainsi, conformément à l'invention, l'antisens peut également être transféré sous la forme d'ADN double brin ou d'un plasmide tel que mentionné ci-dessus en association

ou non avec une molécule favorisant le transfert et/ou en utilisant un faible champs électrique.

L'invention s'étend également à toute application permettant de traiter le cancer  
5 comprenant l'utilisation d'un produit de combinaison mentionné ci-dessus et une troisième substance active utilisée dans le cadre du traitement du cancer. A ce titre, l'invention couvre la tri-thérapie comportant l'administration du produit de combinaison selon l'invention et une troisième substance active.

- 10 La Mbd2/déméthylase est exprimée dans des tumeurs *in vivo* et est surexprimée dans un pourcentage significatif de tumeur d'une manière analogue à Dmnt1. Alors que notre analyse d'un nombre limité de tumeurs ne prouve pas que la Mbd2/déméthylase est généralement dérégulée les cellules cancéreuses, nos données sont compatibles avec ce modèle. Deuxièmement, nous montrons que l'inhibition médiée antisens de la  
15 Mbd2/déméthy-lase conduit à des changements de la méthylation génomique et à une inhibition de la tumorigénèse *in vitro*. Différentes méthodes d'expression d'antisens ont été utilisées pour exclure la possibilité que les changements observés reflètent une certaine propriété idiosyncrasique du vecteur. Une expression transitoire de l'antisens est suffisante pour inhiber la croissance inhibée par un ancrage et un contact, ce qui  
20 indique que la Mbd2/démé-thylase est nécessaire pour le maintien de l'état transformé, et que son inhibition a des effets immédiats sur la croissance des cellules cancéreuses.

De même, l'introduction d'un vecteur exprimant l'antisens de la Mbd2/ déméthylase dans des tumeurs humaines que l'on a fait passer sous forme de xénogreffes chez des  
25 souris nues a provoqué une réduction de la croissance de la tumeur, ce qui montre que la Mbd2/ déméthylase est nécessaire pour le maintien de l'état transformé. Alors que l'expression de l'antisens de la Mbd2/déméthylase inhibe considérablement la tumorigénèse *in vitro*, elle a un effet limité sur les tumeurs *in vivo*. Cela pourrait refléter la difficulté qu'il y a à délivrer et exprimer d'une manière efficace les vecteurs

antisens dans toutes les cellules d'une tumeur *in vivo*, plutôt qu'une indication de l'impact limité de l'inhibition de la cible.

Comme la Mbd2/ déméthylase peut soit réprimer, soit déméthyler les gènes méthylés,  
5 il est possible qu'un certain nombre de gènes soit affecté par l'un ou l'autre de ces processus. L'inhibition de la répression, médiée par la Mbd2/déméthylase, de l'activité de gènes méthylés pourrait se traduire par une activation d'un certain nombre de suppresseurs tumoraux. Par ailleurs, l'activité de déméthylase pourrait être requise pour inhiber une méthylation aberrante des gènes qui sont critiques pour le phénotype  
10 transformé. Une inhibition de la déméthylase pourrait conduire à une méthylation ectopique, des gènes critiques étant rendus silencieux d'une manière stochastique.

Comme les deux activités de Mbd2/déméthylase doivent affecter une large gamme de gènes, un résultat possible pourrait avoir été un effondrement du programme  
15 d'expression des gènes. Une telle possibilité devrait avoir limité le potentiel thérapeutique de l'inhibition de la Mbd2/déméthylase. Cependant, l'analyse du schéma génique des cellules dans lesquelles la Mbd2/déméthylase est inhibé n'étaye pas cette hypothèse.

20 Ainsi, l'inhibition de la Mbd2/ déméthylase se traduit par une répression et par une induction de l'expression des gènes impliqués dans le processus tumorales, mais ne présente pas d'inconvénient pour une application thérapeutique. Des changements de l'expression des gènes après traitement par l'antisens de Mbd2/déméthylase apparaissent limités, or ces changements, renforcés par un agent alkylant, sont  
25 responsables de la forte inhibition de la tumorigénèse *in vitro*.

Ainsi, l'invention propose d'utiliser conjointement la Mbd2/déméthylase comme cible anti-cancéreuse et un agent alkylant de l'ADN. Le fait que le cycle cellulaire des cellules normales ne soit pas affecté par ce traitement, et le fait que ce traitement ne  
30 provoque pas de changements massifs de l'expression des gènes, augmentent l'intérêt

de cette cible. L'inhibition de la Mbd2/déméthylase pourrait avoir un effet thérapeutique à deux niveaux, l'un dans le rétablissement de l'état normal de méthylation génomique par inhibition d'une déméthylase à surrégulation aberrante, et un autre, qui empêche que deviennent silencieux des gènes suppresseurs de tumeur mal méthylés, qui sont essentiels au maintien d'une régulation appropriée de la croissance cellulaire.

**Exemple 1 : Combinaison de thérapie génique (électrotransfert intratumoral de plasmides codant pour l'antisens de la DNA Déméthylase) et de chimiothérapie (injection intramusculaire de bléomycine)**

Deux séries d'expérience ont été réalisées chez la souris nude de 18 à 20g. Les souris ont été implantées mono-latéralement avec des greffons de tumeurs H1299 (tumeurs pulmonaires humaines non à petites cellules) d'environ 20mm<sup>3</sup>. Les tumeurs se sont développées pour atteindre un volume de 20 à 150mm<sup>3</sup>. Les souris ont été triées en fonction de la taille des tumeurs et réparties en lots homogènes atteignant des volumes tumoraux de 50 à 80mm<sup>3</sup> (n=10 à 13). Les souris ont été anesthésiées avec un mélange Kétamine, Xylazine.

**1.1 Expérience 1 : Effet sur la croissance tumorale**

Les résultats sont illustrés à la figure 1 et l'analyse statistique est présentée à la table 1 ci-dessous.

**TABLE 1**

**ANALYSE STATISTIQUE**  
**Expérience 1**

Comparaison statistique	test t de Student Comparaison de moyenne	Log-Rank Kaplan Meier		Risque d'atteindre 1000mm <sup>3</sup> du volume tumoral
		Risque d'atteindre 1000mm <sup>3</sup> (médiane) #	Risque d'atteindre 1000mm <sup>3</sup> (moyenne) #	
Group 1: tumeurs non traitées		14,50		
Group 3: bléomycine 25 µg		44,40		
Group 4: Antisens de la DNA Déméthylase		29,10		
Group 6: Antisens de la DNA Déméthylase + bléomycine 25 µg		52,01		
Antisens de la DNA Déméthylase versus non traité	p < 0,0001	**	p < 0,0001	***
25 µg bléomycine versus non traité	p < 0,0001	**	p < 0,0001	***
Antisens de la DNA Déméthylase + 25 µg bléomycine versus 25 µg bléomycine	p = 0,1079	NS	p = 0,1946	NS
Antisens de la DNA Déméthylase + 25 µg bléomycine versus non traité	p < 0,0001	**	p < 0,0001	***

1.1.1 Tumeurs contrôles : une série de tumeurs n'a subi aucun traitement.

5    1.1.2 Tumeurs traitées avec le gène codant pour l'antisens de la DNA Déméthylase seul :

Cinq électrotransferts de 50 $\mu$ g de plasmide dans 80 $\mu$ L NaCl 150mM ont été réalisés dans les tumeurs aux jours indiqués par les flèches. La solution de plasmide a été 10 injectée longitudinalement en périphérie de la tumeur à l'aide d'une seringue Hamilton. Les faces latérales des tumeurs ont été enduites de gel conducteur et les tumeurs ont été placées entre 2 électrodes plates en acier inoxydable distantes de 0.4 à 0.7 cm. Vingt à 30 sec après l'injection, les plasmides ont été électrotransférés en utilisant un générateur d'impulsions électriques (carrées) du commerce 15 (Electropulsateur PS 15 Jouan). Chaque tumeur a été soumise à 500V/cm délivrés en 8 pulses d'une durée de 20msec à une fréquence de 1 Hertz .

1.1.3 Tumeurs traitées à la bléomycine seule :

20 Vingt-cinq  $\mu$ g de bléomycine/animal dans 50 $\mu$ L de NaCl 150mM ont été injectés en bilatéral dans le muscle tibialis cranialis et 30 minutes après, chaque tumeur a été soumise à 1 électrotransfert comme explicité ci-dessus.

25    1.1.4 Tumeurs traitées avec une combinaison des 2 traitements (antisens et bléomycine) :

Vingt-cinq  $\mu$ g de bléomycine/animal dans 50 $\mu$ L de NaCl 150mM ont été injectés en bilatéral dans le muscle tibialis cranialis et 30 minutes après, 50 $\mu$ g de plasmide antisens dans 80 $\mu$ L NaCl 150mM ont été injectés et électrotransférés. Quatre autres

électrotransferts de 50 $\mu$ g de plasmide antisens dans 80 $\mu$ L NaCl 150mM ont ensuite été réalisés dans les tumeurs aux jours indiqués par les flèches.

Les volumes tumoraux ont été mesurés individuellement pour chaque tumeur à l'aide  
5 d'un pied à coulisse électronique à affichage digital suivant la formule (longueur X largeur X épaisseur )/2.

La médiane des volumes tumoraux a été reportée en graphique, en fonction du temps.

### 1.2 Expérience 2 : Effet sur la croissance tumorale

10

Les résultats sont illustrés à la figure 2 et l'analyse statistique est présentée à la table 2 ci-dessous.

TABLE 2

ANALYSE STATISTIQUE  
Expérience 2

Comparaison statistique	test t de Student Comparaison de moyenne	Log-Rank Kaplan Meier		
		Risque d'atteindre 1000mm <sup>3</sup> de volume tumorat		
Antisens de la DNA Déméthylase versus NaCl /ET	p = 0,0201	*	p = 0,0029	**
25 $\mu$ g bléomycine versus NaCl /ET	p = 0,0008	***	p = 0,0001	***
Antisens de la DNA Déméthylase + 25 $\mu$ g bléomycine versus 25 $\mu$ g bléomycine	p = 0,0088	**	p = 0,0056	**
Antisens de la DNA Déméthylase + 25 $\mu$ g bléomycine / NaCl /ET	p = 0,0001	***	p < 0,0001	***

# : nombre de jours pour atteindre 1000 mm<sup>3</sup> volume tumoral

15    1.2.1 Tumeurs contrôles : Cinq électrotransferts de 80 $\mu$ L NaCl 150mM ont été réalisés dans les tumeurs aux jours indiqués par les flèches.

1.2.2 Tumeurs traitées avec le gène codant pour l'antisens de la DNA Déméthylase seul : Cinquante  $\mu$ L de NaCl 150mM ont été injectés en bilatéral dans le muscle tibialis cranialis et 30 minutes après, un électrotransfert de 50 $\mu$ g de plasmide antisens

dans 80µL NaCl 150mM a été réalisé. Quatre autres électrotransfert de 50µg de plasmide antisens dans 80µL NaCl 150mM ont ensuite été réalisés dans les tumeurs aux jours indiqués par les flèches.

- 5    1.2.3 Tumeurs traitées à la bléomycine seule : Vingt cinq µg de bléomycine/animal dans 50µL de NaCl 150mM ont été injectés en bilatéral dans le muscle tibialis cranialis et 30 minutes après, chaque tumeur a été injectée avec 80µl de NaCL 150mM et soumise à un électrotransfert. Quatre autres électrotransferts de 80µL NaCl 150mM ont ensuite été réalisés dans les tumeurs aux jours indiqués par les flèches.

10

1.2.4 Tumeurs traitées avec une combinaison des 2 traitements (antisens et bléomycine) : Vingt cinq µg de bléomycine/animal dans 50µL de NaCl 150mM ont été injectés en bilatéral dans le muscle tibialis cranialis et 30 minutes après, un électrotransfert de 50µg de plasmide antisens dans 80µL NaCl 150mM a été réalisé.

- 15    Quatre autres électrotransfert de 50µg de plasmide antisens dans 80µL NaCl 150mM ont ensuite été réalisés dans les tumeurs aux jours indiqués par les flèches.

Les volumes tumoraux ont été mesurés individuellement pour chaque tumeur à l'aide d'un pied à coulisse électronique à affichage digital suivant la formule (longueur X largeur X épaisseur )/2.

20    La médiane des volumes tumoraux a été reportée en graphique, en fonction du temps.

### 1.3 Résultats et conclusion

- 25    La combinaison de thérapie génique avec le gène codant pour l'antisens de la DNA Déméthylase humaine et de chimiothérapie à la bléomycine permet d'induire un délai cumulé de 31 à 38 jours dans la croissance des tumeurs H1299.  
Un tel délai de croissance tumorale n'a jamais été atteint par les traitements administrés isolément tels que la thérapie génique seule (15 à 18 jours) ou la chimiothérapie seule.
- 30    (17 à 30 jours) (Table 3 ci-dessous).

**TABLE 3****Combinaison de la thérapie génique et de la chimiothérapie**

**Effect de multiple électrotransferts intratumoraux de plasmides codant pour l'antisens de la DNA Déméthylase humaine associés avec un traitement à la bléomycine, sur la croissance des tumeurs H1299**

**a) Délais de croissance tumorale**

	Expérience 1		Expérience 2	
	J1000	délais de croissance Traitement versus non traité	J1000	délais de croissance Traitement versus électro/NaCl
non traitées	J14			
ET/NaCl			J21	
Antisens de la Déméthylase	J29	15 jours	J39	18 jours
Bléomycine 25µg	J44	30 jours	J38	17 jours
Antisens de la Déméthylase/bléomycine 25µg	J52	38 jours	J52	31 jours

J1000\* = nombre de jours nécessaires pour atteindre un volume tumoral de 1000mm<sup>3</sup>

La combinaison de la thérapie génique et de la chimiothérapie induit un effet synergique sur la guérison des tumeurs puisque 30 à 40% des guérisons de tumeurs ont été obtenues avec le traitement combiné, comparativement à 10% seulement avec les 5 traitements administrés isolément. (Table 4 ci-dessous).

**TABLE 4****Combinaison de thérapie génique et de chimiothérapie****b) Guérison de tumeurs**

	Expérience 1	Expérience 2
	nombre de tumeurs guéries	nombre de tumeurs guéries
non traitées	0 / 11	
NaCl/électro		0 / 11
Antisens de la Déméthylase	0 / 13	1 / 10 J53
Bléomycine 25 µg	1 / 13 J54	1 / 11 J53
Antisens de la Déméthylase/bléomycine 25µg	3 / 11 J33/J69/J69	4 / 10 J32/J35/J53/J53

Rem: les tumeurs guéries sont des tumeurs qui ne sont plus mesurables

Jx: absence de tumeurs jusqu'au jour indiqué au delà duquel la souris est décédée

**REFERENCES**

- 5        1. Razin, A. & Szyf, M. (1984) *Biochim Biophys Acta* 782, 331-42.
- 10      2. Razin, A. & Cedar, H. (1977) *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 2725-8.
- 15      3. Razin, A. & Riggs, A. D. (1980) *Science* 210, 604-10.
- 20      4. Razin, A. (1998) *Embo J* 17, 4905-8.
- 25      5. Baylin, S. B., Herman, J. G., Graff, J. R., Vertino, P. M. & Issa, J. P. (1998) *Adv Cancer Res* 72, 141-96.
- 30      6. Baylin, S. B. (1992) *AIDS Res Hum Retroviruses* 8, 811-20.
- 35      7. Feinberg, A. P. & Vogelstein, B. (1983) *Nature* 301, 89-92.
- 40      8. Szyf, M. (1994) *Trends Pharmacol Sci* 15, 233-8.
- 45      9. Robertson, K. D., Uzvolgyi, E., Liang, G., Talmadge, C., Sumegi, J., Gonzales, F. A. & Jones, P. A. (1999) *Nucleic Acids Res* 27, 2291-8.
- 50      10. Weiss, A. & Cedar, H. (1997) *Genes Cells* 2, 481-6.
- 55      11. Jost, J. P., Siegmann, M., Sun, L. & Leung, R. (1995) *J Biol Chem* 270, 9734-9.

12. Ramchandani, S., Bhattacharya, S. K., Cervoni, N. & Szyf, M. (1999) Proc Natl Acad Sci U S A 96, 6107-12.
- 5  
13. Hendrich, B. & Bird, A. (1998) Mol Cell Biol 18, 6538-47.
14. MacLeod, A. R. & Szyf, M. (1995) J Biol Chem 270, 8037-43.
15. Laird, P. W., Jackson-Grusby, L., Fazeli, A., Dickinson, S. L., Jung, W. E., Li, E., Weinberg, R. A. & Jaenisch, R. (1995) Cell 81, 197-205.
- 10  
16. Ramchandani, S., MacLeod, A. R., Pinard, M., von Hofe, E. & Szyf, M. (1997) Proc Natl Acad Sci U S A 94, 684-9.
17. Szyf, M. (1998) Cancer Metastasis Rev 17, 219-31.
- 15  
18. Baylin, S. B. & Herman, J. G. (2000) Trends Genet 16, 168-74.
19. Meehan, R. R., Lewis, J. D. & Bird, A. P. (1992) Nucleic Acids Res 20, 5085-92.
- 20  
20. Lewis, J. D., Meehan, R. R., Henzel, W. J., Maurer-Fogy, I., Jeppesen, P., Klein, F. & Bird, A. (1992) Cell 69, 905-14.
- 25  
21. Cross, S. H., Meehan, R. R., Nan, X. & Bird, A. (1997) Nat Genet 16, 256-9.
22. Nan, X., Ng, H. H., Johnson, C. A., Laherty, C. D., Turner, B. M., Eisenman, R. N. & Bird, A. (1998) Nature 393, 386-9.

23. Jones, P. L., Veenstra, G. J., Wade, P. A., Vermaak, D., Kass, S. U., Landsberger, N., Strouboulis, J. & Wolffe, A. P. (1998) *Nat Genet* 19, 187-91.
- 5 24. Ng, H. H., Zhang, Y., Hendrich, B., Johnson, C. A., Turner, B. M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Reinberg, D. & Bird, A. (1999) *Nat Genet* 23, 58-61.
- 10 25. Ng, H. H., Jeppesen, P. & Bird, A. (2000) *Mol Cell Biol* 20, 1394-406.
26. Boeke, J., Ammerpohl, O., Kegel, S., Moehren, U. & Renkawitz, R. (2000) *J Biol Chem*.
- 15 27. Wade, P. A., Gegonne, A., Jones, P. L., Ballestar, E., Aubry, F. & Wolffe, A. P. (1999) *Nat Genet* 23, 62-6.
28. Bhattacharya, S. K., Ramchandani, S., Cervoni, N. & Szyf, M. (1999) *Nature* 397, 579-83.
- 20 29. Vilain, A., Vogt, N., Dutrillaux, B. & Malfoy, B. (1999) *FEBS Lett* 460, 231-4.
30. Szyf, M., Theberge, J. & Bozovic, V. (1995) *J Biol Chem* 270, 12690-6.

REVENDICATIONS

- 5     1. Produit de combinaison comprenant au moins un oligonucléotide antisens du gène codant pour la déméthylase MBD2 et au moins un agent utilisé en chimiothérapie antitumorale pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps destiné au traitement des maladies prolifératives et inflammatoires.
- 10    2. Produit de combinaison selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'antisens du gène codant pour la déméthylase MBD2 comprend au moins :
- a) 15 nucléotides consécutifs de la séquence SEQ ID N°1 ou de sa séquence complémentaire ou de la séquence SEQ ID No 2, ou
- b) une séquence capable de s'hybrider de manière sélective à l'une des 15 séquences définies en a).
3. Produit de combinaison selon l'une des revendications 1 à 2, caractérisé en ce que l'agent utilisé en chimiothérapie antitumorale est sélectionné parmi les composés appartenant à la famille des bléomycines, en particulier la bléomycine.
- 20    4. Produit de combinaison selon l'une des revendications 1 à 2, caractérisé en ce que l'agent utilisé en chimiothérapie antitumorale est sélectionné parmi les agents antinéoplastiques capables de méthyler l'ADN, notamment parmi les agents méthylants, tels que la streptozotocine, la procarbazine, la dacarbazine et la 25 Temozolomide.
5. Produit de combinaison selon l'une des revendications 1 à 2, caractérisé en ce que l'agent utilisé en chimiothérapie antitumorale est sélectionné parmi les agents chloroéthylants, les agents chloroethylants, notamment :
- 30    1-(2-chloroethyl)-3-(2-hydroxyethyl)-1-nitrosourea,

- 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea,  
1-(2-chloroethyl)-3-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl-1-nitrosourea,  
1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea,  
1-(2-chloroethyl)-3-(4-methylcyclohexyl)-1-nitrosourea,  
5 1-[N-(2-chloroethyl)-N-nitrosoureido]ethylphosphonic acid diethyl ester,  
2-chloroethylmethylsulfonylmethanesulfonate.
6. Produit de combinaison selon l'une des revendications 1 à 2, caractérisé en ce que l'agent utilisé en chimiothérapie antitumorale est sélectionné parmi :
- 10 - les cytolytiques divers tels que la dacarbazine, l'hydroxycarbamide, l'asparaginase, la mitoguazone et la plicamycine,
- les agents pro-apoptotiques sélectionnés parmi les dérivés des glucocorticoïdes, les inhibiteurs des topoisomérases tels que les inhibiteurs de la topoisomérase 15 2, par exemple les anthracyclines, l'epipodophyllotoxine tel que l'étoposide, les inhibiteurs de la topoisomérase 1, par exemple les dérivés de la camptothecine,
- les antimétabolites tels que les antifolates, par exemple le méthotrexate, les antipurines, par exemple la 6-mercaptopurine, les antypyrimidiques, par exemple la 5-fluorouracile,  
20 - parmi les antimitotiques tels que les vinca-alcaloïdes, les taxoïdes tel que le taxotere,
- 25 7. Produit de combinaison selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'oligonucléotide antisens du gène codant pour la déméthylase MBD2 est porté par vecteur comportant un promoteur permettant son expression efficace dans une cellule eucaryote.

8. Produit de combinaison selon l'une des revendications 7, caractérisé en ce qu'il comporte une séquence poly A de terminaison de transcription.
9. Produit de combinaison selon la revendication 7, caractérisé en ce que le vecteur  
5 consiste en un plasmide.
10. Produit de combinaison selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que l'oligonucléotide antisens est un ADN double brin.
11. Produit de combinaison selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'il comprend en outre un ou plusieurs éléments favorisant le transfert de l'oligonucléotide antisens dans les cellules cibles.  
10
12. Produit de combinaison selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que l'oligonucléotide antisens est adapté à une administration in vivo par électrotransfert, de préférence en utilisant des champs électriques faibles compris entre 1 et 600 V/cm.  
15
13. Produit de combinaison selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce qu'il comporte en outre un ou plusieurs véhicule(s) pharmaceutiquement acceptable(s).  
20
14. Produit de combinaison selon l'une des revendications 1 à 13, particulier pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps destiné au traitement du cancer.
15. Produit de combinaison selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisé en ce qu'il est adapté à une administration par injection intratumorale.  
25

1 / 2

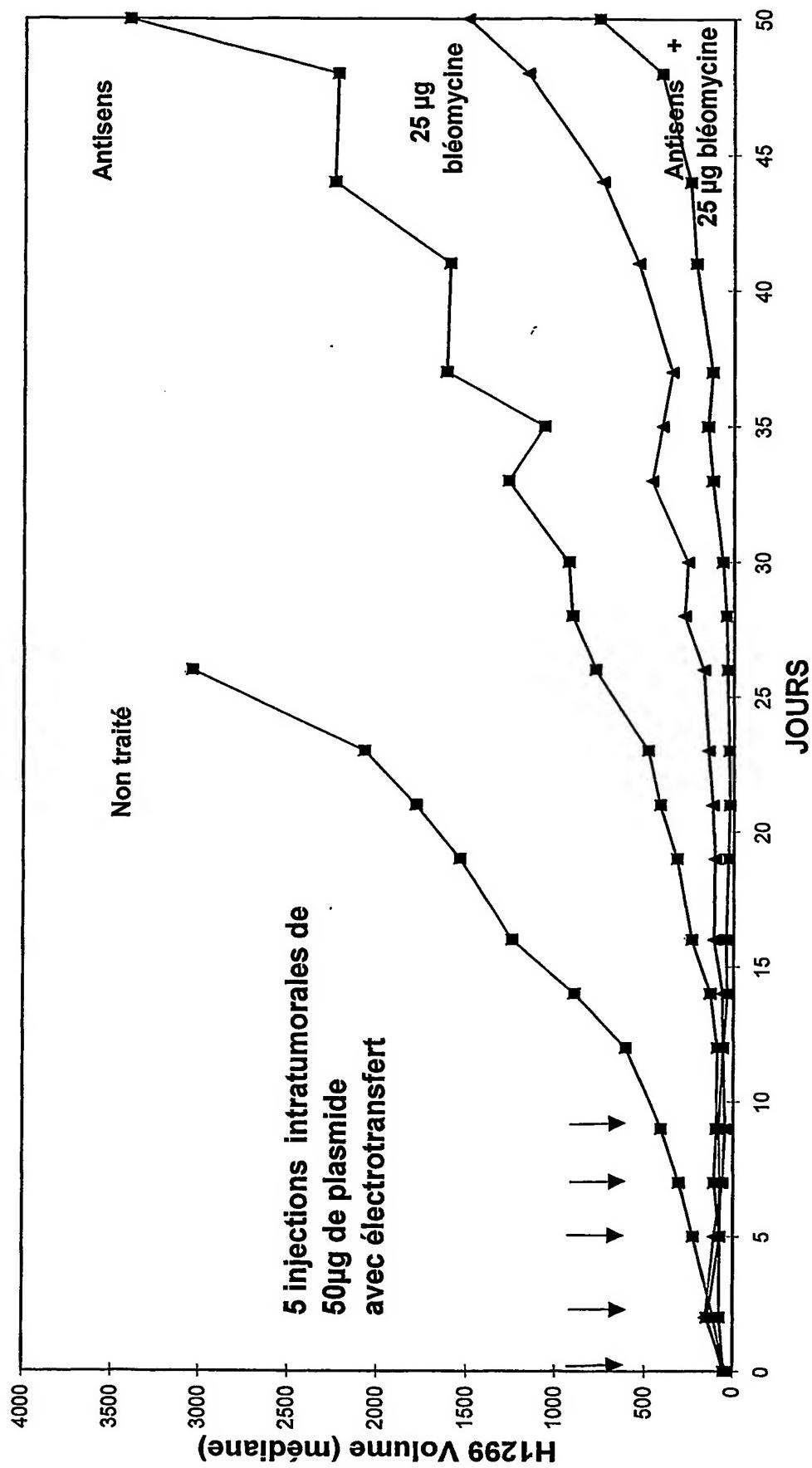


FIGURE 1

2 / 2

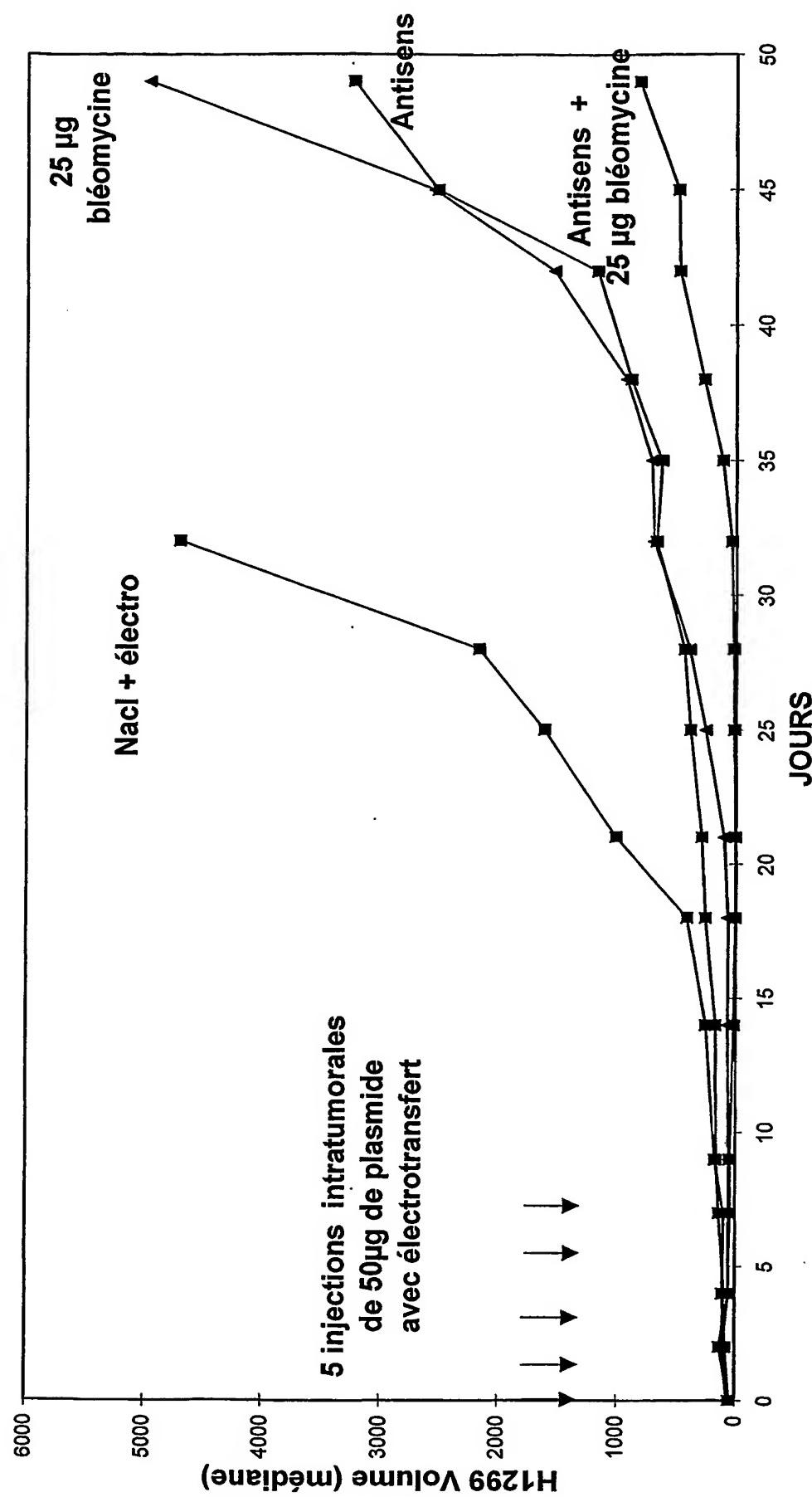


FIGURE 2

## LISTE DE SEQUENCES

<110> Centre National de la Recherche Scientifique - CNRS

<120> Combinaison chimiothérapie et antisens de la DNA déméthylase

<130> D19864

<150> FR 02/02 879

<150> 2002-03-07

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1966

**<212> ADN**

<213> Homo sapiens

<400> 1

gggggcgtgg	ccccgagaag	gcggagacaa	gatggccgcc	catagcgctt	ggaggaccta	60
agaggcgtg	gcggggcca	cgcggggc	aggagggccg	ctctgtgcgc	ccccgctcta	120
tgtatgttc	gcgcgtcccc	cgcgcgcgc	gctgcgggcg	ggcggggct	ccgggattcc	180
aagggtctgg	ttacggaga	agcgcagcgc	cggctggga	gggggcttgg	tgcgcgegca	240
cccgggggga	ggcgctgt	gcccggagca	ggaggagggg	gagagtgcgg	cgggcgccag	300
cggcgctggc	ggcgactccg	ccatagagca	ggggggccag	ggcagcgcgc	tgcggccgtc	360
cccggtgagc	ggcggtgcgc	ggaaaggcgc	tgggggcggc	ggccgtggcc	gggggctgg	420
gaagcaggcg	ggccggggcg	gccccgtctg	tggccgtggc	cgggggccgg	gcccgtggccg	480
gggacgggga	cggggccggg	gcccggccg	cgggccgtccc	ccgagtgccg	gcagcgccct	540
tggcggcgac	ggcgccggct	gccccggcgg	ccgcagcggt	ggcgccggcg	ccccccggcg	600
ggagccggtc	cctttccctgt	cggggagcgc	ggggccgggg	cccaagggac	cccgggccac	660
ggagagcggg	aagaggatgg	attgccccggc	cctccccccc	ggatggaaga	aggaggaagt	720
gatccgaaaa	tctggctaa	gtgctggcaa	gagcgatgtc	tactacttca	gtccaagtgg	780
taagaagttc	agaagcaagc	ctcagggtggc	aaggtaactg	ggaaataactg	ttgatctcag	840
cagtttgac	ttcagaactg	gaaagatgt	gccttagtaaa	ttacagaaga	acaacacag	900
actgcgaaac	gatcctctca	atcaaaaataa	gggttaaacca	gacttgaata	caacattgcc	960
aatttagacaa	acagcatcaa	ttttcaaaaca	accggtaacc	aaagtccaaa	atcatcctag	1020
taataaaagtg	aaatcagacc	cacaacgaat	gaatgaacag	ccacgtcagc	ttttctggga	1080
gaagaggcta	caaggactta	gtgcatcaga	tgttaacagaa	caaattataa	aaaccatgga	1140
actaccacaa	ggtcttcaag	gagtttgtcc	aggttagcaat	gatgagaccc	ttttatctgc	1200
tgttgcctagt	gctttgcaca	caagctctgc	gccaatcaca	*ggcaagtct	ccgctgtgt	1260
ggaaaagaac	cctgctgttt	ggcttaacac	atctcaaccc	ctctgcaaag	tttttattgt	1320
cacagatgaa	gacatcagga	aacagaaga	gcgagttacag	caagtacgca	agaaatttgg	1380
agaagcactg	atggcagaca	tcttgcgcg	agctgtgtat	acagaagaga	tggatattga	1440
aatggacagt	ggagatgaag	cctaagaata	tgatcaggtt	actttcgacc	gactttcccc	1500
aagrgaaaaat	tcctagaaaat	tgaacaaaaaa	tgtttccact	ggcttttgc	tgtaaagaaaa	1560
aaaatgtacc	cgagcacata	gagctttta	atagcactaa	ccaatgcctt	tttagatgt	1620
tttttgcgt	atatatctat	tattcaaaaa	atcatgttta	ttttgagttcc	taggacttaa	1680
aatttagtctt	ttgtatatac	aaggcaggacc	ctaagatgaa	gctgagctt	tgatgccagg	1740
tgcataatctac	tggaaatgt	gcacttacgt	aaaacatttgc	tttccccccac	agtttaataa	1800
agaacagatc	aggaaattct	aataaatttgc	ccagttaaag	attattgtga	cttcactgt	1860
tataaacata	tttttatact	ttattgaaag	gggacacccgt	tacattcttgc	catcatcact	1920
gttaaagacaa	ataaaatgtt	atattcaca	aaaaaaaaaa	aaaaaaa		1966

<210> 2

<211> 1411

<212> ADN

<212> ADN

<220>

<223> ARN messager antisens de la déméthylogèse

<400> 2

```

cgcatgcattt cataagcttg ctcgagtcata gatTTTTTTT ttttttgc tttttttttt 60
atcattttt ttgtcttaca gtgatgtgg aagaatgtac aggtgtcccc tttcaataaa 120
gtataaaaat atgtttatat acagtgaagt cacaataatc tttaactggg aaattttttt 180
agaatttcctg atctgttctt attaaaactg tggggggaaac aaatgtttta cgtaagtgt 240
acatTTCCAG tagattgcac ctggcataa aagctcagct tcatttttagg gtcctgtt 300
atattacaaa agactaattt taagtccat gactaaaaat aaacatgatt ttttgaataa 360
tagatataata cataaaaat acatctaaa aggcatggg tagtgctatt aaaaagctct 420
atgtgctcgg gtacatTTT ttcttacag gcaaaagcca gtggaaacat ttttgttcaa 480
tttcttaggaa ttttccycttg gggaaagtgc gtcgaaaagtt acctgtatcat attcttaggc 540
ttcatctcca ctgtccattt caatatccat ctcttctgtt tcagcagctc gcgacaagat 600
gtctgcccattt agtgcttctt ccaattttttt gctgtacttgc tgtaactcgct cttcctgttt 660
cctgtatgtct tcatctgttca caataaaagc ttgcagagg gggttggatgt tgtaagcc 720
aacagcaggg ttcttttcca cagcagcggg gacttgcctt gtgattggcg cagagcttgt 780
gtgcaaaagca ctggcaacag cagataaaaag ggtctcatca ttgctacctg gaccaactcc 840
ttgaagacct ttgggttagtt ccattttttt tataattttgt tctgttacat ctgtatgcact 900
aagtcccttgtt agcctttctt cccagaaaaag ctgacgtggc tgttcattca ttcgttgtgg 960
gtctgattttc acttttattac taggatgatt tttttttttt gttaccgggtt gtttggaaat 1020
tgtatgtgtt ttgtctaatttgc gcaatgttgtt attcaagtctt gttttaccct tattttgatt 1080
gagaggatcg ttccgcagtc tctgtttttt cttctgtaat ttactaggca tcatctttcc 1140
agttctgaag tcaaaaactgc tgagatcaac agtatttccc aggtacccctt ccaactgagg 1200
tttgcattttc aacttcttac cacttggactt gaagtagtagt acatcgctct tgccagcact 1260
tagcccaagat ttccggatca ttcccttccctt cttccatccg gggggggaggg ccggggcaatc 1320
catcctcttc ccgtctccgg tggcccgggg tccccctgggc cccggccccgg cgctccccga 1380
cggggaaaggg accggctccg tcgacgcggc c 1411

```